

巨噬细胞的吞噬功能与动脉粥样硬化斑块的稳定性

黄晓菁, 江立生 综述, 陈颖敏 审校

(上海交通大学医学院附属仁济医院心内科, 上海市 200001)

[关键词] 动脉粥样硬化斑块; 巨噬细胞; 凋亡细胞; 酪氨酸激酶受体; 清除凋亡细胞作用

[摘要] 吞噬性清除凋亡细胞是巨噬细胞的重要生理功能, 在动脉粥样硬化斑块的发生、发展和维护斑块的稳定性过程中具有重要作用。本文就巨噬细胞对凋亡细胞识别、摄取和吞噬的分子机制, 以及在维护动脉粥样硬化斑块稳定性中的作用作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Macrophage Phagocytic Function and Atherosclerotic Lesion Stability

HUANG Xiao-Jing, JIANG Li-Sheng, and CHEN Ying-Min

(Department of Cardiology, Renji Hospital of Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerotic Lesion; Macrophage; Apoptotic Cells; Tyrosine Kinase Receptor; Efferocytosis

[ABSTRACT] Clearance of apoptotic cells that have significant impacts on the composition, progression and stability of atherosclerotic is an important physiologic function of macrophage. This review will address the molecular and cellular mechanisms that are thought to govern macrophage recognizing, ingesting and swallowing apoptotic cells as well as the role of improving the stability of atherosclerosis.

粥样硬化斑块的不稳定和破溃引起的急性冠状动脉事件是冠心病致死致残的重要原因和关键机制之一。尽管采用机械和药物方法可显著降低急性冠状动脉事件的死亡率, 但是迄今为止还不能从根本上降低急性冠状动脉事件的发病率。因此从病因学上预防动脉粥样硬化斑块的形成和进展, 从病理解剖上维护斑块的稳定性, 对降低急性冠状动脉事件发生率, 并进一步降低其致残率、致死率具有重要意义。

新近观点认为, 动脉粥样斑块内凋亡细胞堆积过多以及巨噬细胞对凋亡细胞吞噬性清除能力不足是不稳定性斑块形成和进展的重要原因。因此有学者提出如能通过药物或其它方法提高巨噬细胞的吞噬功能, 则可使斑块内凋亡细胞清除增加, 对维护斑块的稳定性和降低急性冠状动脉事件可能具有潜在的作用。本文针对巨噬细胞对凋亡细胞识别、摄取

和吞噬的分子机制, 以及在维护斑块稳定性中的作用作一综述。

1 动脉粥样硬化斑块从早期到进展期的变化

1.1 动脉粥样硬化斑块从早期到进展期的病理生理变化

在动脉粥样硬化斑块的早期, 单核细胞从动脉内皮细胞之间移入内膜下成为巨噬细胞, 通过吞噬脂质转变为泡沫细胞并开始凋亡形成最早的脂质条纹病变。而在斑块进展期, 凋亡细胞发生继发性坏死, 细胞膜崩解, 脂质被释放, 这些脂质和坏死细胞碎片累积形成了坏死核, 坏死核的扩大可使斑块突入动脉腔内引起管腔狭窄, 还使纤维帽变薄易破溃, 继而发生急性冠状动脉事件。从上述病理生理变化中, 可以发现细胞的凋亡与坏死始终贯穿于动脉粥样硬化斑块的发展, 那么斑块内的这些凋亡细胞对病变又有何作用及影响?

在病变早期, 对动脉粥样硬化易感小鼠的巨噬细胞敲除促凋亡基因如 p53、Bax、Rb 后, 斑块的发展明显加速。研究发现, p19ARF 缺陷载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠与对照组载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠相比, 无论是在动脉粥样硬化病变处还是体外培养的巨噬细胞、平滑肌细胞都可显著减缓细胞凋亡, 同时发现实

[收稿日期] 2010-11-17

[基金项目] 国家自然科学基金(81000086) 和上海市自然科学基金(09ZR1418100) 资助

[作者简介] 黄晓菁, 硕士研究生, E-mail 为 hxjv107@163.com。江立生, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病的机制研究, E-mail 为 jls1025@yahoo.com.cn。陈颖敏, 主任医师, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 chenyingmin@med-mail.com.cn。

验组小鼠主动脉的粥样硬化斑块范围扩大^[1]。这些都说明在病变早期适度的巨噬细胞凋亡对病变的进展起抑制作用。然而在病变进展期,巨噬细胞发生凋亡则产生不同的作用:即吞噬脂质的巨噬细胞发生凋亡后如未能及时被清除则发生继发性坏死,坏死细胞碎片同时也是强烈的促炎因子和致栓因子,可诱发一系列炎症反应和触发急性血栓栓塞,最终导致急性冠状动脉事件。

1.2 巨噬细胞的吞噬功能在斑块早期到进展期的变化

研究发现,在动脉粥样硬化斑块由早期向晚期进展的过程中,巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬功能发生了变化,即在病变早期巨噬细胞 efferocytosis 是十分高效的,即使斑块内泡沫细胞发生凋亡后,也能被巨噬细胞有效识别和吞噬,从而使富含脂质的凋亡细胞得到及时清除,使脂质不会大量积累,从而限制了斑块的发展。而在病变的进展期,许多因素如炎症环境、脂质负载、吸烟等促使巨噬细胞 efferocytosis 下降。此时斑块内凋亡的泡沫细胞不能得到及时清除,并发生继发性坏死,形成坏死核,而坏死核内的炎症环境会诱导周围巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶(MMP),分解胶原;同时坏死细胞自身也通过释放细胞内胰酶或毒性物质直接破坏纤维帽胶原物质。这些物质与坏死核自身对纤维帽的物理压力共同作用导致纤维帽的破裂,斑块破裂后未清除的凋亡细胞又可成为组织因子(TF)^[2]激发凝血反应形成血栓。此外坏死核形成的同时,溶血磷脂酸类的衍生物得到积累,这类衍生物进一步增强血小板的凝集^[3]。因此巨噬细胞 efferocytosis 缺陷是动脉粥样硬化斑块进展和不稳定并最终导致急性冠状动脉事件的重要原因之一。

2 巨噬细胞 efferocytosis 的生理功能、过程及其调控

2.1 巨噬细胞 efferocytosis 的生理功能

巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬会产生一系列重要结果,其中最重要的是抑制炎症反应的信号传导并激活抗炎反应通路,而吞噬坏死细胞则产生与上述反应相反的结果,促发炎症反应。除此之外,巨噬细胞吞噬凋亡细胞还可影响巨噬细胞自身及周围细胞的募集、存活和增殖,如吞噬凋亡细胞可使转化生长因子(TGF- β)分泌,TGF- β 反过来可抑制单核细胞向炎症区聚集、促进吞噬细胞的存活和抑制吞噬

细胞增殖。更重要的是巨噬细胞吞噬凋亡的 T 细胞可产生血管内皮生长因子(VEGF),促进内皮增殖修复血管内皮。如果这些巨噬细胞吞噬凋亡细胞产生的作用发生在动脉粥样硬化斑块内,则对斑块的限制、血管内皮修复以及血管再生都有重要影响。

2.2 巨噬细胞实现 efferocytosis 的生理过程

巨噬细胞吞噬凋亡细胞是一个十分复杂的生理过程,包括了巨噬细胞对凋亡细胞的识别、摄取和吞噬,许多分子都参与了这个过程,以下就这一过程的分子机制进行阐述。

2.2.1 凋亡细胞上的配体 巨噬细胞能够识别凋亡细胞在于凋亡细胞“食我”信号表达增强“非食我”信号表达下降。最重要的“食我”信号是凋亡细胞膜上磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露^[4],PS 是一种带负电荷的膜磷脂,正常时位于细胞膜的内层。当细胞凋亡时,由于磷脂酶的激活和由 ATP 依赖的氨基磷酸酯转移酶量减少或活性受抑,促使 PS 持续暴露在膜表面。PS 是多种吞噬受体的配体,对 efferocytosis 起着关键作用。Kagan 等^[5]研究发现氧化磷脂(oxPS)在 PS 外翻存在情况下可进一步触发巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬。

2.2.2 巨噬细胞上的识别受体 巨噬细胞有许多识别受体,通过这些受体直接或间接与凋亡细胞上配体结合完成 efferocytosis 过程。这些受体主要有 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体、清道夫受体(SR)、ATP 结合盒转运子(ABCA1、ABCA7)、PS 受体、酪氨酸激酶 Tyro3 亚家族受体(Tyro3、Axl、Mer)、Fc γ 受体、CRT 受体等。其中酪氨酸激酶 Tyro3 亚家族受体最为重要,Axl、Tyro3、Mer 都表达于巨噬细胞膜上,它们共用相似的配体。Thorp 等^[6]把实验组 MerTK^{-/-} ApoE^{-/-}小鼠和对照组 MerTK^{+/+} ApoE^{-/-}小鼠进行西方饮食 10 周和 16 周,并取主动脉根病变处分析,发现 MerTK^{-/-} ApoE^{-/-}小鼠 10 周末端脱氧核苷酰基转移酶介导性 TUNEL 阳性凋亡细胞明显增多,efferocytosis 下降;16 周时斑块中坏死细胞增多,坏死核扩大。但 Axl、Tyro3 单基因或双基因突变对巨噬细胞的吞噬功能并没有明显的影响,表明了 Tyro3 亚家族受体成员在 efferocytosis 中发挥不同的作用,Mer 起关键作用,而 Axl、Tyro3 促进巨噬细胞上的 Mer 与凋亡细胞结合时快速磷酸化^[7]。MerTK 除了参与巨噬细胞识别、摄取凋亡细胞外还有其它作用:①MerTK 可以调节促炎症反应,MerTK 缺陷小鼠炎症因子 TNF- α 、IL-1 产生增多^[8],用脂多糖刺激后 MerTK 缺陷小鼠 88.2% 死于内毒素性休克而野生型为 6.7%^[9]。②MerTK 可以防止巨噬细胞凋

亡。这些作用是由于 efferocytosis 下降的继发改变还是其本身作用,目前研究还不清楚。

2.2.3 识别结合的桥梁分子 在对凋亡细胞进行识别时,有些受体可直接与凋亡细胞表面的配体结合,有些则需要桥梁分子或其他受体的协同作用。如:①Gas-6 和清道夫受体 A (SR-A)。MerTK 通过 Gas-6 的桥梁作用与凋亡细胞表面暴露的 PS 结合^[10]。Gas-6 主要由平滑肌细胞 (SMC) 产生^[11],在进展期病变斑块中,凋亡 SMC 增多,Gas-6 合成减少,影响 MerTK 与 PS 的结合,降低凋亡细胞的清除,进而形成恶性循环。SR-A 可促进 MerTK 磷酸化,使其有活性^[12]。②MFG-E8。MFG-E8 是一种乳粘素,主要由活化的巨噬细胞分泌,它连接凋亡细胞上的 PS 与巨噬细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体^[13]。MFG-E8 在粥样硬化斑块和正常动脉内都有表达,但在进展期病变斑块中表达下降。Hafid 等以 MFG-E8^{-/-}LDLR^{-/-}小鼠为实验组,MFG-E8^{+/+}LDLR^{-/-}小鼠为对照组,给予高脂饮食 8 周后病变大小有显著差异,实验组病变范围明显扩大。此外 MFG-E8 的缺失可使抗炎症因子 IL-10 产生减少,促炎症因子 IFN- α 产生增多。

2.2.4 摄取的信号传递通路 在线虫中 efferocytosis 的信号通路有两条:一条是 ced-4、ced-6 和 ced-7 (哺乳动物同源物分别为 LRP、GULP、ABC-A1 或 ABC-A7),另一条是 UNC-73、MIG-2、ced-12、ced-5 和 ced-2 (哺乳动物同源物分别为 TRIO、RhoG、ELMO、Dock180、Crk II)^[14]。它们共同的下游通道是 RhoGTP 酶的平衡。Rho 家族 GTP 酶中 Rac-1 有正性调节 efferocytosis,而其同家族成员 RhoA 为负性调节作用。Rac-1 诱导巨噬细胞形成皱褶以利胞饮,RhoA 则诱导张力纤维、焦点粘着和细胞扩展的形成,不利于巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬^[15]。

2.3 巨噬细胞 efferocytosis 的调控

当坏死核形成和坏死碎片的积累,巨噬细胞的周围环境就富含了促炎症因子,其中 TNF- α 最为重要。TNF- α 可与巨噬细胞上的 TNF 受体结合,激活胞质磷脂酶 A2 (cPLA₂),产生花生四烯酸,接着生成 ROS,RhoA 上有个半胱氨酸是 ROS 的直接作用位点,ROS 与 RhoA 结合后激活 RhoA,就抑制了 efferocytosis 功能^[16]。

有选择地激活 M2 型巨噬细胞,可优先清除凋亡细胞且特异性分泌抗炎症因子 TGF- β 、IL-10;而原经典激活巨噬细胞是 M1 型,特异性分泌炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1^[17]。其中的分化机制目前还不

清楚,有待进一步研究。

在吸烟者中,无论现在仍吸烟者还是过去曾吸烟者,efferocytosis 都比未吸烟者低,而过去曾吸烟者比现在仍吸烟者 efferocytosis 得到改善^[18]。

富含 ox-LDL 的巨噬细胞,因 ox-LDL 改变由 CD14、TLR4 参与的肌动蛋白信号传导而导致 efferocytosis 下降^[19]。还有研究表明 ox-LDL 能强有力地增强促炎症核因子 NF- κ B 表达,并增强促炎症因子 mRNA 和蛋白的表达,加剧斑块内炎症反应^[20]。

3 调控巨噬细胞 efferocytosis 对维护动脉粥样硬化斑块稳定性的作用及意义

巨噬细胞 efferocytosis 对限制进展期斑块发展,防止斑块破溃,促进斑块稳定具有重要作用,因此增强 efferocytosis 可减少凋亡细胞继发性坏死的发生,限制坏死核的扩大,稳定斑块,预防急性冠状动脉事件的发生。最新研究发现阿司匹林可通过作用于斑块内巨噬细胞而减缓动脉粥样硬化斑块的发展,其机制是降低巨噬细胞 MMP-9 mRNA 表达,并抑制 NF- κ B 亚基的表达,此外阿司匹林还能上调 ABCA1 和 B 类 I 清道夫受体 (SR-BI) 的表达,促使胆固醇从细胞内转运出^[21]。

海帕西啉可通过抑制 Fe 从巨噬细胞中流出,使巨噬细胞内 Fe 增多,从而使斑块稳定,因为 Fe 可作为还原剂抑制脂质超氧化^[22] 防止 efferocytosis 下降。他汀类药物可通过抑制 RhoA 的异戊烯化强于 Rac-1,降低 RhoA 的膜定位和 RhoGTP 酶活性,此外它还抑制氧化应激、TNF- α 、MMP 的产生,从而增强 efferocytosis^[23]。阿奇霉素可通过上调甘露糖受体 (MR) 的表达来增强 efferocytosis,在体外用阿奇霉素处理的巨噬细胞 MR 表达增加 50%,吞噬作用也明显增强^[24]。4-苯基丁酸钠 (PBA) 一种应用广泛的化学伴侣蛋白。研究发现它可通过增强巨噬细胞与凋亡细胞膜上 PS 的结合而增强巨噬细胞 efferocytosis,且这种增强只针对凋亡细胞,对 IgG 包裹的红细胞或乳胶微球却无效^[25]。

4 展望

对 efferocytosis 与动脉粥样硬化斑块的关系及 efferocytosis 生理过程的深入研究,打开了一个治疗冠心病的全新思维,也提供了新药物研发的切入点。如研发可上调巨噬细胞重要识别受体 MerTK、Axl、Tyro3 的表达,抑制 TNF- α 、ROS 的分泌和 RhoA 的

活性的药物来增强 efferocytosis。虽然目前这方面的实际应用研究还处于起步阶段,但由于 efferocytosis 对动脉粥样硬化斑块稳定的重要作用,efferocytosis 实际应用研究前景是十分广阔的。

【参考文献】

- [1] González-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinué Á, et al. p19ARF deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55 (20): 2 258-268.
- [2] Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental [J]? *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 736-746.
- [3] Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92: 1 086-094.
- [4] Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal [J]. *Curr Biol*, 2001, 11: R795-805.
- [5] Kagan VE, Gleiss B, Tyurina YY, et al. A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing fas-mediated apoptosis [J]. *J Immunol*, 2002, 169: 487-499.
- [6] Thorp E, Cui D, Schrijvers DM, et al. MerTK receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 1 421-428.
- [7] Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, et al. Macrophages and dendritic cells use different Axl/MerTK/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 5 635-642.
- [8] Li Y, Gerbod-Giannone MC, Seitz H. Cholesterol-induced apoptotic macrophages elicit an inflammatory response in phagocytes, which is partially attenuated by the Mer receptor [J]. *J Biochem*, 2006, 281: 6 707-717.
- [9] Camenisch TD, Koller BH, Earp HS. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- α production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock [J]. *J Immunol*, 1999, 162: 3 498-503.
- [10] Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, et al. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6 [J]. *J Biochem*, 2000, 127: 411-417.
- [11] Benzakour O, Kanthou C. The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin [J]. *Blood*, 2000, 95: 2 008-014.
- [12] Todt JC, Hu B, Curtis JL. The scavenger receptor SR-A I / II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase MerTK during apoptotic cell uptake by murine macrophages [J]. *J Leuko Biol*, 2008, 84: 510-514.
- [13] Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice [J]. *Circulation*, 2007, 115: 2 168-177.
- [14] deBakker CD, Haney LB, Kinchen JM, et al. Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-42/ELMO [J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 2 208-216.
- [15] Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS, et al. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (Efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease [J]. *Chest*, 2006, 129: 1 673-682.
- [16] McPhillips K, Janssen WJ, Ghosh M, et al. TNF- α inhibits macrophage clearance of apoptotic cells via cytosolic phospholipase A2 and oxidant-dependent mechanisms [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 8 117-126.
- [17] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Immunology*, 2010, 10: 36-46.
- [18] Hodgel S, Hodgel G, Ahern J, et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37: 748-755.
- [19] Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1 561-568.
- [20] Zhao Y, Liu Y, Zhang WP, et al. WIN55212-2 ameliorates atherosclerosis associated with suppression of pro-inflammatory responses in ApoE-knockout mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649: 285-292.
- [21] Lu L, Liu H, Peng J, et al. Regulations of the key mediators in inflammation and atherosclerosis by Aspirin in human macrophages [J]. *Lipids Health Dis*, 2010, 9: 16-23.
- [22] Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability [J]. *J Exp Biol Med*, 2007, 232: 1 014-020.
- [23] Morimoto K, Janssen WJ, Fessler MB, et al. Lovastatin enhances clearance of apoptotic cells (efferocytosis) with implications for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 7 657-665.
- [24] Hodgel S, Hodge G, Jersmann H, et al. Azithromycin improves macrophage phagocytic function and expression of mannose receptor in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178: 139-148.
- [25] Schrijvers DM, Tabas IA. Sodium 4-phenylbutyrate, a widely used chemical chaperone, stimulates clearance of apoptotic cells by macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 29 (7): e110.

(此文编辑 文玉珊)